

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07183

研究課題名(和文) シアル酸認識受容体はアレルギー性気管支肺アスペルギルス症の診断候補分子になるか？

研究課題名(英文) Is sialic acid recognition receptor a candidate molecule for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis?

研究代表者

山中 将敬 (Yamanaka, Masahiro)

国際医療福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：50582102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では*Aspergillus fumigatus* 感染時に好酸球が増殖し、活性化した好酸球から炎症性顆粒タンパク質が放出され組織傷害の恐れがある。*Aspergillus fumigatus* 菌体上の糖鎖末端に α 2,3-シアル酸および α 2,6-シアル酸が結合している糖タンパク質が発現しており、ヒトの好酸球にはシアル酸を認識する受容体シグレック8が発現している。本研究では、シグレック8が*Aspergillus fumigatus* 菌体上の糖タンパク質と会合するかを検討し、*Aspergillus fumigatus* に発現している糖タンパク質のシアル酸を介して会合していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シグレック8がシアル酸を介して*Aspergillus fumigatus* 菌体上の糖タンパク質と会合することを明らかにした。この結果は*Aspergillus fumigatus* 感染時における生体内の好酸球機能を解明する手がかりとなりうる可能性がある。*Aspergillus fumigatus* 感染によって発症する様々な疾患に対して*Aspergillus fumigatus* 上の糖鎖リガンドと好酸球上の受容体(レクチン)の相互作用を標的とした新たな診断や治療の候補として利用できる機構を提案する成果が得られた。

研究成果の概要(英文)： During *Aspergillus fumigatus* infection, eosinophils proliferate in the human organism, and the release of inflammatory granule proteins from activated eosinophils may result in tissue injury. There are a number of glycoproteins with α 2,3-sialic acid and α 2,6-sialic acid attached to the ends of glycans on *Aspergillus fumigatus* fungi, and the receptor Siglec-8 is expressed on human eosinophils. In this study, we examined whether Siglec-8 associates with glycoproteins on *Aspergillus fumigatus* and found that the association is mediated by sialic acid, a glycoprotein expressed on *Aspergillus fumigatus*.

研究分野：生化学

キーワード：シグレック シアル酸 *Aspergillus fumigatus*

1. 研究開始当初の背景

健常者はアスペルギルス属による感染はほとんど成立しないが、喘息やアトピーなどの素因があるヒトはアレルギー性の肺疾患であるアレルギー性気管支肺アスペルギルス症を発症することがある。原因となる菌種はアスペルギルス属 *Aspergillus fumigatus* が多いことが報告されている。

ヒトは空気中に浮遊する *Aspergillus fumigatus* の分生子(孢子)を吸引し、気道に侵入した分生子が組織へ定着することからはじまると考えられる。ヒトの生体では侵入した分生子に対する免疫炎症反応の過程で好酸球が増殖する傾向がある。

2. 研究の目的

Aspergillus fumigatus の菌体上糖鎖末端にはシアル酸が結合している。さらに、高病原性の *Aspergillus fumigatus* ではシアル酸の結合量が増加していることが報告されている。

一方、ヒトをはじめとする生物にはシアル酸を認識する受容体としてシグレック(Sialic acid binding immuno-globulin like lectin)が存在し、ヒトでは複数のシグレックファミリー分子が存在している。特にヒト好酸球上にはシグレック 8 が発現しており、シアル酸を含む糖鎖リガンドとの結合を介し機能制御をしていると考えられる。

本研究は、受容体(糖鎖を認識するタンパク質: レクチン)と糖鎖リガンド(シアル酸)に注目し *Aspergillus fumigatus* に対する好酸球上受容体の関与を解析して、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症の診断へ応用可能な候補分子の探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 組換えシグレックファミリータンパク質の作製と糖鎖結合能の特異性

ヒト IgG の定常領域(Fc)を連結し分泌タンパク質として発現させることができる pCAG-Neo human Fc ベクターへ各種シグレックファミリーの細胞外領域を挿入した。得られたプラスミド DNA を HEK293T 細胞へリポフェクション法により導入し、培養液中に分泌された組換えシグレックタンパク質を protein A-セファロースにより回収し精製した。

シグレック 8 は 6'-スルホシアリルルイス X((NeuNAc α 2,3(6-O-Sulfate)Gal β 1,4(Fuc α 1,3)GlcNAc)構造を特異的に認識することが知られている。作製した組換えタンパク質の糖鎖結合能の特異性を検討するために protein A を介して各種の組換えシグレックファミリータンパク質をプレートへ固相化した。そして、6'-スルホシアリルルイス X とビオチンが結合しているポリアクリルアミドをプローブとして用いて糖鎖結合の特異性を検討した。

(2) 糖鎖末端にシアル酸を含む *Aspergillus fumigatus* に発現している糖タンパク質の検出

Aspergillus fumigatus の溶解物を SDS-PAGE 法とウエスタンブロット 法により分離した。その後、 α 2,3-シアル酸へ結合するイヌエンジュ *Maackia amurensis* レクチン(MAM)もしくは α 2,6-シアル酸へ結合するニホンニワトコ *Sambucus sieboldiana* レクチン(SSA)を用いたレクチンブロットにより検出した。

(3) シグレック 8 と会合する *Aspergillus fumigatus* に発現している糖タンパク質の同定

Aspergillus fumigatus の溶解物は糖鎖中の α 2,3-シアル酸結合のみを特異的に切断できる α 2,3-シアリダーゼ(シアル酸結合切断酵素)により処理した。 α 2,3-シアリダーゼ処理した *Aspergillus fumigatus* の溶解物は MAM を用いたレクチンブロットより、保有している糖鎖末端から α 2,3-シアル酸結合の除去を確認後、ビオチン化標識試薬にて *Aspergillus fumigatus* の溶解物をビオチン化標識した。

未処理もしくは α 2,3-シアリダーゼ処理したビオチン化 *Aspergillus fumigatus* の溶解物へ組換えシグレック 8 タンパク質と protein A-セファロースを混合し処理した。シアル酸依存的に組換えシグレック 8 タンパク質と共沈してくる *Aspergillus fumigatus* 分子を検出するため SDS-PAGE 法とウエスタンブロット法により分離した。

さらに、シアル酸を介してシグレック 8 と会合している糖タンパク質分子を同定するため α 2,3-シアリダーゼ処理によって変化のあったバンドを回収し、プロテオーム(LC-MS/MS)解析をおこなった。

(4) 糖鎖リガンド刺激時のシグレック 8 を介するシグナル伝達経路の解析

シグレック 8 は細胞内領域に 2 カ所のチロシン残基を保有している。シグレック 8 の細胞内

領域チロシンの変異体(シグレック 8(Y447F)、シグレック 8(Y470F)、シグレック 8(Y447F・Y470F))を作製した。シグレック 8 と細胞内領域で会合することが示唆されているチロシンホスファターゼ SHP-1 もしくは SHP-2 に注目し、脱リン酸化阻害剤過バナジン酸ナトリウム処理時に SHP-1 もしくは SHP-2 とシグレック 8 野生型およびそれぞれのシグレック 8 変異体との会合状況を免疫沈降法により解析した。さらに、シグレック 8 を糖鎖リガンド刺激時における SHP-1 もしくは SHP-2 の会合についても解析した。

(5) シグレック 8 を特異的に検出できる抗体作製

シグレックはファミリー分子を形成しており、シグレック 8 のみを特異的に検出できる抗体作製をおこなった。現在、購入可能な抗シグレック 8 抗体は海外メーカーにより販売しているもののみである。今後、シグレック 8 の発現量や疾患との関連を解析するためにも有用な抗シグレック 8 抗体を保有している意義は大きい。

シグレック 3、シグレック 5、シグレック 6、シグレック 7、シグレック 8、シグレック 9、シグレック 10、シグレック 14 のアミノ酸配列を比較し、シグレック 8 に特異的なアミノ酸配列であり折り畳み構造(フォールディング)後の配置から 3 種類のペプチド : RDARKRDKGS、: RAGDRPYQDA、: YKSQLNYKTK を抗原候補とした。キャリアタンパク質 KLH と結合させた各抗原ペプチドをウサギへ複数回免疫し、血清に含まれる抗シグレック 8 抗体の力価を解析した。

4 . 研究成果

(1) 組換えシグレックファミリータンパク質の作製と糖鎖結合能の特異性

シグレック 8/pCAG-Neo human Fc を導入した HEK293T 細胞の培養液 50 mL から約 50 μ g の組換えシグレック 8 タンパク質を精製することができた。同様にシグレック 3、シグレック 5、シグレック 6、シグレック 7、シグレック 9、シグレック 10、シグレック 14 の組換えタンパク質を精製した。得られた各種の組換えタンパク質は他の夾雑タンパク質のない単一のバンドとして確認でき、アスパラギン側鎖に結合した *N*-結合糖鎖を特異的に切断する PNGase F 処理することで分子量が変化したため細胞内の小胞体およびゴルジ体を経て糖鎖修飾が行われていることがわかった。

糖鎖結合能の解析をするとシグレック 8 は 6'-スルホシアリルルイス X に対して極めて強く、シグレック 3 はわずかであるが 6'-スルホシアリルルイス X に対して結合性を示した。その他のシグレックファミリー分子は全く 6'-スルホシアリルルイス X に対して全く結合しなかった。

今回、糖鎖修飾をされ、6'-スルホシアリルルイス X に対して結合する組換えシグレック 8 タンパク質を作製することができた。作製した組換えシグレック 8 タンパク質が *Aspergillus fumigatus* に発現している分子と会合するかを探索した。

(2) 糖鎖末端にシアル酸を含む *Aspergillus fumigatus* に発現している糖タンパク質の検出

Aspergillus fumigatus 上には多数のシアル酸を含む糖タンパク質と糖脂質が存在しており、 α 2,3-シアル酸結合を含む糖鎖構造より α 2,6-シアル酸結合を含む糖鎖構造の存在量が多いことも報告されている。

レクチンプロットの結果、 α 2,3-シアル酸結合を含む糖鎖構造を認識する MAM レクチンは 15、20、28 kDa の糖タンパク質と結合した。一方、 α 2,6-シアル酸結合を含む糖鎖構造を認識する SSA レクチンは 15、20、28、80 kDa の糖タンパク質と結合した。

(3) シグレック 8 と会合する *Aspergillus fumigatus* に発現している糖タンパク質の同定

至適条件で α 2,3-シアリダーゼ処理した *Aspergillus fumigatus* の溶解物は α 2,3-シアル酸結合のみが切断され、 α 2,6-シアル酸結合は保持されていることが確認できた。組換えシグレック 8 タンパク質と会合する *Aspergillus fumigatus* の溶解物中の分子を探索すると 28 kDa の糖タンパク質がシアル酸依存的に結合していることを明らかにした。

回収した 28 kDa の糖タンパク質をプロテオーム解析すると、*Aspergillus fumigatus* の菌体膜タンパク質であることがわかった(投稿論文準備中のため同定した分子名は省略)。

(4) 糖鎖リガンド刺激時のシグレック 8 を介するシグナル伝達経路の解析

シグレック 8 の細胞内領域のチロシン残基へホスファターゼ SHP-1 および SHP-2 がどのように会合しているかをシグレック 8 の細胞内領域チロシンの変異体(シグレック 8(Y447F)、シグレック 8(Y470F)、シグレック 8(Y447F・Y470F))を用いて脱リン酸化阻害剤過バナジン酸ナトリウム処理下で解析した結果、SHP-1 はシグレック 8 の 447 番目と 470 番目のチロシンと会合し、SHP-2 はシグレック 8 の 447 番目のチロシンと会合していた。

次に、シグレック 8 発現細胞が 6'-スルホシアリルルイス X に結合する条件(糖鎖リガンド刺激)を見出し、糖鎖リガンド刺激が SHP-1 および SHP-2 の会合を誘引するかを検討したが、糖鎖リガンド刺激したシグレック 8 に対しては SHP-1 および SHP-2 は会合しなかった。

(5) シグレック 8 を特異的に検出できる抗体作製

3 種類のペプチドを抗原として : RDARKRDKGS、 : RAGDRPYQDA、 : YKSQLNYKTK をそれぞれのウサギへ複数回免疫し ELISA 法によって力価を測定した。十分な力価を得た後に抗血清を回収し、シグレック 8 に対する結合性を確認するため組換えシグレック 8 タンパク質やシグレック 8 発現細胞を標的として、ELISA 法、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法を実施したが 3 種の抗血清とも組換えシグレック 8 タンパク質やシグレック 8 発現細胞とは結合せず、抗原として用いたペプチドのみと結合する抗血清であることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Marcin Nowicki, Logan C. Houston, Sarah L. Boggess, Anthony S. Aiello, Miriam Pay Milans, Margaret E. Staton, Mitsuhiro Hayashida, Masahiro Yamanaka, Shigetoshi Eda, Robert N. Trigiano	4 . 巻 10
2 . 論文標題 Species diversity and phylogeography of <i>Cornus kousa</i> (Asian dogwood) captured by genomic and genic microsatellites	5 . 発行年 2020年
3 . 雑誌名 Evolutionary Applications	6 . 最初と最後の頁 8299-8312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.6537.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 山中将敬、青木 美佳、土屋 奈津子、塩原 楓
2 . 発表標題 シアル酸認識受容体Siglec-8を介する シグナル伝達経路
3 . 学会等名 第143回 日本薬学会
4 . 発表年 2023年

1 . 発表者名 山中将敬、石井優花、小杉真梨菜、高橋侑佳子
2 . 発表標題 組換えシグレック-8 タンパク質の糖鎖結合能の解析
3 . 学会等名 日本薬学会第142年会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 山中将敬
2 . 発表標題 可溶性組換えシグレックタンパク質の精製
3 . 学会等名 第141回 日本薬学会
4 . 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際医療福祉福祉大学 薬学部 ホームページ
<https://otawara.iuhw.ac.jp/gakubu/yakugaku/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------